

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004年4月22日 (22.04.2004)

PCT

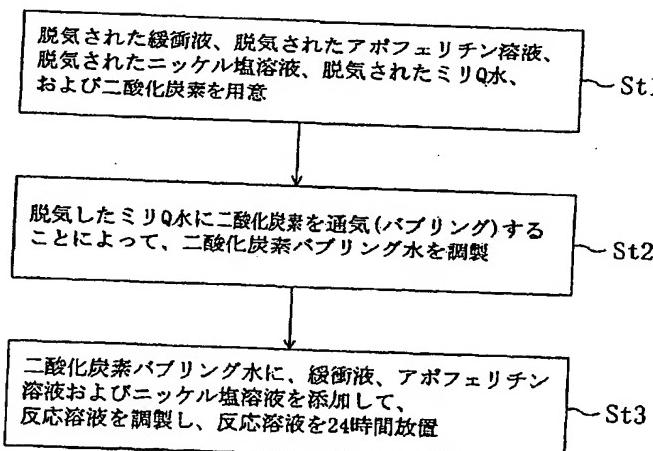
(10) 国際公開番号
WO 2004/033366 A1

- | | | |
|----------------------------|---|--|
| (51) 国際特許分類 ⁷ : | B82B 3/00, H01L
21/8247, 27/115, 29/06, 29/788, 29/792 | (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 松下電器産業株式会社 (MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒571-8501 大阪府 門真市 大字門真1006番地 Osaka (JP). |
| (21) 国際出願番号: | PCT/JP2003/011810 | (72) 発明者; および |
| (22) 国際出願日: | 2003年9月17日 (17.09.2003) | (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 奥田 充宏 (OKUDA,Mitsuhiko) [JP/JP]; 〒577-0827 大阪府 東大阪市衣摺 2-10-7 Osaka (JP). 吉村 英恭 (YOSHIMURA,Hideyuki) [JP/JP]; 〒215-0023 神奈川県 川崎市麻生区 片平 1-3-5 Kanagawa (JP). 山下一郎 (YAMASHITA,Ichiro) [JP/JP]; 〒631-0003 奈良県 奈良市 中登美ヶ丘 4-1-6-210 Nara (JP). |
| (25) 国際出願の言語: | 日本語 | |
| (26) 国際公開の言語: | 日本語 | |
| (30) 優先権データ: | 特願2002-275598 2002年9月20日 (20.09.2002) JP
特願2003-105676 2003年4月9日 (09.04.2003) JP | |

[総葉有]

(54) Title: METHOD FOR PREPARING NANO-PARTICLE AND NANO-PARTICLE PREPARED BY SAID PREPARATION METHOD

(54) 発明の名称: ナノ粒子の製造方法及び該製造方法によって製造されたナノ粒子



St1..PROVIDING DEGASSED BUFFER SOLUTION, DEGASSED APOFERRITIN SOLUTION, DEGASSED NICKEL SALT SOLUTION, DEGASSED MILLI-Q WATER AND CARBON DIOXIDE

St2..PASSING (BUBBLING) CARBON DIOXIDE THROUGH DEGASSED MILLI-Q WATER, TO PREPARE CARBON DIOXIDE BUBBLED WATER

St3..ADDING BUFFER SOLUTION, APOFERRITIN SOLUTION AND NICKEL SALT SOLUTION TO CARBON DIOXIDE BUBBLED WATER, TO PREPARE LIQUID REACTION MIXTURE, AND ALLOWING REACTION MIXTURE TO STAND FOR 24 HR

(57) Abstract: A method for preparing nano-particles which comprises a step of, in a solution containing a protein having a cave-like portion, a metal ion, and a carbonate ion and/or a hydrogencarbonate ion, forming nano-particles comprising a compound of said metal ion in the cave-like portion of said protein. The above compound includes a hydroxide. The above metal ion is preferably a nickel ion (Ni^{2+}), a chromium ion (Cr^{2+}) or a copper ion (Cu^{2+}). The method allows the preparation of nano-particles exhibiting a greatly narrow distribution of particle diameter.

WO 2004/033366 A1

[総葉有]



(74) 代理人: 角田 嘉宏, 外(SUMIDA, Yoshihiro et al.); 〒650-0031 兵庫県神戸市中央区東町123番地の1 貿易ビル3階 有古特許事務所 Hyogo (JP).

(81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GI, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,

AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 國際調査報告書
- 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

本発明のナノ粒子の製造方法は、空洞部を有するタンパク質、金属イオン、炭酸イオン及び／又は炭酸水素イオンを含む溶液中で、該タンパク質の空洞部内に該金属イオンの化合物からなるナノ粒子を形成させる工程を含む。前記化合物としては、例えば水酸化物が挙げられる。前記金属イオンは、好ましくはニッケルイオン (Ni^{2+})、クロムイオン (Cr^{2+}) または銅イオン (Cu^{2+}) のいずれかである。上記方法によって、粒径が均一なナノ粒子を製造することができる。

明 紹 書

ナノ粒子の製造方法及び該製造方法によって製造されたナノ粒子

5 [技術分野]

本発明は、タンパク質の空洞部を利用したナノ粒子の製造方法、該製造方法によって製造されたナノ粒子及び該製造方法の製造工程で生成されたナノ粒子－タンパク質複合体に関する。

[背景技術]

10 これまでの機能材料開発の主流は、所望の機能を発現させる新規化合物の探索、合成によって行われている。しかしながら、近年は、物質をナノメートルサイズまでに微細化したナノ粒子を作製することで、バルク状態では得られない新機能を発現させることが望まれるようになっている。特に、近年注目されている量子効果デバイスを作製するためには、半導体や金属化合物を中心とする無機材料のナノ粒子を作製することが強く望まれている。

従来、ナノ粒子を作製する方法は、物理的粉碎法および化学的合成法などによって行われている。例えば、物理的粉碎法は、セラミックスを焼成する際の出発材料を得るために広く用いられている。また、
20 化学的合成法としては、長鎖の有機化合物の間で、塩化金酸を還元することによって金のナノ粒子を作製する方法などがある。ここで、長鎖の有機化合物は、金粒子が成長して巨大化することを阻害している。

また、有機化合物とナノ粒子との複合体を作り、化学反応させて均一な粒子を作る方法もある。この応用としては、自己組織化单分子膜
25 (SAM膜)を形成するための材料に金原子を固定し、上記材料を金原子を中心にして集合させることによって、表面にSAM膜が形成された金のナノ粒子を得る方法もある。さらに、ナノ粒子を形成する材料を含むミセルをつくり、ミセル中の化学反応を用いてナノ粒子を

作製することも行われている。

量子効果デバイスを作製するためには、直径が同一のナノ粒子を得ることが不可欠である。ナノ粒子において電子がとり得るエネルギー 5 レベルは、数ナノメートルのオーダーでは、直径に依存して大きく変化する。このため、量子効果を持つナノ粒子を電子回路に応用するためには、直径が一定であることが重要になる。

しかし、上述の従来の方法では直径が均一なナノ粒子を得ることは難しい。例えば、物理的粉碎法では、そもそも直径をミクロンサイズよりも小さくすることが困難であり、ナノメートルオーダーに近づいたとしても直径を一定にするメカニズムがない。このため、得られるナノ粒子の直径には必然的に大きなバラツキが生じる。また、化学的合成法では、化学反応を利用しているため、これもまた得られるナノ粒子の直径には必然的に大きなバラツキが生じる。また、所要時間、コストの面でも非常に不利である。

一方、バイオテクノロジーを他分野に応用する試みの一つとして、金属化合物を保持する機能を有するタンパク質であるアポフェリチンに金属または金属化合物を取り込ませ、ナノオーダーの均一なサイズのナノ粒子を作製しようという研究がある。ナノ粒子の用途に応じて種々の金属あるいは金属化合物等をアポフェリチンに導入すべく研究が進められている。

ここで、アポフェリチンについて説明する。アポフェリチンは、生物界に広く存在するタンパク質であり、生体内では必須微量元素である鉄の量を調節する役割を担っている。鉄または鉄化合物とアポフェリチンとの複合体はフェリチンと呼ばれる。鉄は必要以上に体内に存在すると生体にとって有害であるため、余剰の鉄分はフェリチンの形で体内に貯蔵される。そして、フェリチンは必要に応じて鉄イオンを放出し、アポフェリチンに戻る。

第1図は、アポフェリチンの構造を示す模式図である。第1図に示

すように、アポフェリチン1は、1本のポリペプチド鎖から形成されるモノマーサブユニットが非共有結合により24個集合した分子量約46万の球状タンパク質であり、その直径は約12nmで、通常のタンパク質に比べ高い熱安定性と高いpH安定性を示す。アポフェリチン1の中心には直径約6nmの空洞状の保持部4があり、外部と保持部4とはチャネル3を介してつながっている。例えば、アポフェリチン1に2価の鉄イオンが取り込まれる際、鉄イオンはチャネル3から入り、一部のサブユニット内にあるferrroxidase center（鉄酸化活性中心）と呼ばれる場所で酸化された後、保持部4に到達し、保持部4の内表面の負電荷領域で濃縮される。そして、鉄原子は3000～4000個集合し、フェリハイドライト($5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)結晶の形で保持部4に保持される。保持部4に保持された金属原子を含むナノ粒子の直径は、保持部4の直径とほぼ等しく、約6nmとなっている。

このアポフェリチンを用いて、人工的に鉄以外の金属や金属化合物を担持させたナノ粒子ーアポフェリチン複合体が作製されている。

現在までに、マンガン (P. Mackle, 1993年、J. Amer. Chem. Soc. 115, 8471-8472ページおよびF. C. Meldrumら、1995年、J. Inorg. Biochem. 58, 59-68ページを参照)、ウラン (J. F. Hainfeld, 1992年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 11064-11068ページを参照)、ベリリウム (D. J. Price, 1983年、J. Biol. Chem. 258, 10873-10880ページを参照)、アルミニウム (J. Fleming, 1987年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7866-7870ページを参照)、および亜鉛 (D. PriceおよびJ. G. Joshi, 1982年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 3116-3119ページを参照)といった金属あるいは金属化合物のアポフェリチンへの導入が報告されている。これらの金属あるいは金属化合物からなるナノ粒子の直径も、アポフェリチンの保持部4の直径とほぼ等しく、約6nmとなる。

自然界において、鉄原子を含むナノ粒子がアポフェリチン内に形成される過程の概略は次の通りである。

アポフェリチン1の外部と内部とを結ぶチャネル3（第1図参照）の表面には、pH 7～8の条件下でマイナス電荷を持つアミノ酸が露出しており、プラス電荷を持っている鉄(II)イオンは静電相互作用によりチャネル3に取り込まれる。アポフェリチン1の保持部4の内表面には、チャネル3の内表面と同じく、pH 7～8でマイナス電荷を持つアミノ酸残基であるグルタミン酸残基が多く露出しており、チャネル3から取り込まれた鉄(II)イオンはferrroxidase centerで酸化され、内部の保持部4へと導かれる。そして、静電相互作用により鉄イオンは濃縮されて、フェリハイドライト($\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)結晶の核形成が起こる。

その後、順次取り込まれる鉄イオンがこの結晶の核に付着して酸化鉄からなる核が成長し、直径6nmのナノ粒子が保持部4内に形成される。以上が、鉄イオンの取り込みと酸化鉄からなるナノ粒子形成の概略である。

なお、ここまで鉄イオンのアポフェリチンへの取り込みメカニズムについて述べたが、これまでに導入が報告されている他の金属イオンについては、鉄イオンとほぼ同じメカニズムで進むと考えられる。しかしながら、上述の方法によって空洞部内に取り込むことができる金属イオンは特定のものに限定されていた。

[発明の開示]

本発明は、タンパク質の空洞部を利用したナノ粒子の製造方法であって、これまでタンパク質の空洞部内でのナノ粒子の形成が報告されていなかったニッケルイオン(Ni^{2+})、クロムイオン(Cr^{2+})、銅イオン(Cu^{2+})等の金属イオンからなる粒子径が均一なナノ粒子を得ることができる方法を提供することを目的とする。

本発明は、内部に空洞部を有するタンパク質、金属イオン、炭酸イ

オン及び／又は炭酸水素イオンを含む溶液中で、該タンパク質の空洞部内に該金属イオンの化合物からなるナノ粒子を形成させる工程を含む、ナノ粒子の製造方法である。

前記化合物としては、例えば水酸化物が挙げられる。

5 前記金属イオンは、好ましくはニッケルイオン (Ni^{2+})、クロムイオン (Cr^{2+}) または銅イオン (Cu^{2+}) のいずれかである。

前記溶液の pH は、好ましくは前記金属イオンの水酸化物の沈殿点とほぼ同じである。

10 前記金属イオンとして、ニッケルイオンを用いた場合、前記溶液の pH は、好ましくは 8 以上 9 以下である。

また、前記金属イオンとして、ニッケルイオンを用いた場合、前記溶液は、好ましくは、さらにアンモニウムイオンを含むものとし、この場合、前記溶液の pH は、好ましくは 8.3 を越えて 8.65 以下とする。

15 例えば、前記タンパク質は、アポフェリチン、Dps タンパク質、CCMV タンパク質、TMV タンパク質またはヒートショックプロテインの少なくとも一つである。

例えば、前記溶液は、それに二酸化炭素を通気することによって生成した炭酸イオン及び／又は炭酸水素イオンを含むものである。

20 前記ナノ粒子を形成した後、タンパク質を熱処理によって除去する工程をさらに含むものであってもよい。

また、本発明は、金属イオンの化合物からなるナノ粒子であって、内部に空洞部を有するタンパク質、該金属イオン、炭酸イオン及び／又は炭酸水素イオンを含む溶液中で、該タンパク質の空洞部内に形成されたナノ粒子である。

また、本発明は、内部に空洞部を有するタンパク質と、該タンパク質の空洞部内に形成されたナノ粒子とからなる複合体であって、前記ナノ粒子は、金属イオンの化合物からなるナノ粒子であって、該タン

パク質、該金属イオン、炭酸イオン及び／又は炭酸水素イオンを含む溶液中で、該タンパク質の空洞部内に形成されたナノ粒子である、複合体である。

[図面の簡単な説明]

5 第1図は、アポフェリチンの構造を示す模式図である。

第2図は、実施形態1のニッケル化合物ーアポフェリチン複合体の作製方法を表すフローチャートである。

第3図は、不揮発性メモリセルの製造方法を示す工程断面図である。

10 第4図は、ドット体を基板の表面上に2次元状に配列及び固定する方法を示す工程断面図である。

第5図は、複合体を基板の表面上に2次元状に配列及び固定する方法について説明する図である。

第6図は、不揮発性メモリセルの上面図である。

15 第7図は、実施例2におけるナノ粒子の形成状態を表す電子顕微鏡写真である。

第8図は、実施例3の各硫酸ニッケルアンモニウム濃度における時間と、アポフェリチン濃度及び形成収率との関係を示す図である。

第9図は、実施例3における硫酸ニッケルアンモニウム濃度と形成効率との関係を示す図である。

20 第10図は、実施例4におけるナノ粒子の形成状態を表す電子顕微鏡写真である。

第11図は、実施例5におけるpHと、形成収率(a)及び形成効率(b)との関係を示す図である。

[発明を実施するための最良の形態]

25 以下、本発明の実施形態について図面を参照しながら説明する。

(実施形態1)

第1図および第2図を参照しながら本実施形態のナノ粒子の作製方法を説明する。

第2図は、本実施形態のニッケル化合物のナノ粒子を内包したタンパク質からなる複合体（以下、ニッケル化合物ーアポフェリチン複合体ともいう）の作製方法を表すフローチャートである。

まず、第2図に示すように、ステップS_t1では、HEPESとCAPSOとの混合溶液からなる緩衝液、アポフェリチン溶液、ニッケル塩溶液、ミリQ水、二酸化炭素を用意する。このとき、緩衝液、アポフェリチン溶液、ニッケル塩溶液およびミリQ水は、脱気したもの用意する。

次に、ステップS_t2では、脱気したミリQ水に二酸化炭素を通気（バーリング）することによって、二酸化炭素バーリング水を調製する。

次に、ステップS_t3では、上記ステップS_t2で得られた二酸化炭素バーリング水に、緩衝液、アポフェリチン溶液およびニッケル塩溶液を添加し、反応溶液を調製する。この後、反応溶液を24時間放置する。

なお、以上に説明したニッケル化合物ーアポフェリチン複合体を作製するための操作は、すべて室温、もしくはアポフェリチンが変性しない温度範囲にて、スターラーで攪拌しながら行なう。

上記の操作によって、アポフェリチン1の保持部4にニッケルイオン（Ni²⁺）の化合物が導入され、ニッケル化合物ーアポフェリチン複合体が形成される。

アポフェリチンを含めて、タンパク質はDNA情報から作製され、公知の方法で多数複製することは容易である。また、同じDNAから多数複製されたタンパク質が、オングストロームの精度で同じ構造であることは周知である。このため、本実施形態で用いるアポフェリチンが有する空洞状の保持部4は、全て同じ大きさと形状を有する。

従って、本実施形態のように、タンパク質内にナノ粒子を作製すれば、ナノ粒子の直径がタンパク質により規定されるので、粒径が均一

なナノ粒子が得られる。例えば、本実施形態では、ナノ粒子の直径は、アポフェリチンの保持部の直径とほぼ同じ 6 nm になる。

本実施形態ではタンパク質としてアポフェリチンを用いたが、空洞部を有するタンパク質であれば、单一のサブユニットから構成されているタンパク質であっても、複数のサブユニットから構成されているタンパク質であってもアポフェリチンの代わりに用いることができる。また、タンパク質は、その空洞部の形状が球状のものに限定されることはなく、ロッド状、リング状等の空洞部を有するものであっても良い。例えば、Dps タンパク質、ウイルスタンパク質、ヒートショックプロテインを用いることができる。Dps タンパク質（直径 9 nm であり、内部に直径 4 nm の保持部を有する球殻状タンパク質）を用いれば、直径が 4 nm のナノ粒子を作製することができる。ウイルスタンパク質としては、例えば、CPMV、CCMV、HSV、Rotavirus、Reovirus、LA-1、Polyoma、CaMV、HPV、Ross River、SPV-4、φX174、FHV、HRV-14、Polio 等のウイルスのタンパク質が挙げられる。好ましくは、CPMV、CCMV のウイルスタンパク質を用いることができる。本実施形態の方法によると、使用するタンパク質の空洞部の形状、大きさに応じたナノ粒子が形成されることになる。本明細書におけるナノ粒子とは、長径 50 nm 以下であって、粒子として安定に存在する大きさ以上の粒子をいう。一例を挙げるのであれば、長径 1 nm 以上 50 nm 以下の粒子がナノ粒子に該当する。

また、本実施形態では、ニッケル化合物からなるナノ粒子を作製する場合について説明したが、クロム、銅の金属原子を含む化合物からなるナノ粒子を作製する場合にも本実施形態の方法を適用することができる。尚、本実施形態の方法により形成されたナノ粒子を構成する金属化合物は、添加する金属イオン等によって異なるが、例えば、水酸化物及び／又は酸化物である。

クロム化合物からなるナノ粒子を作製する場合、本実施形態で用いたニッケル塩溶液の代わりに、クロム塩溶液を反応溶液中に混合する。他の条件は、本実施形態に述べた通りである。銅化合物からなるナノ粒子を作製する場合、本実施形態で用いたニッケル塩溶液の代わりに、
5 銅塩溶液を反応溶液中に混合する。他の条件は、本実施形態に述べた通りである。

本実施形態のナノ粒子の形成には、反応溶液中に炭素水素イオン (HCO^{3-}) 及び／又は炭酸イオン (CO_3^{2-}) が存在することが重要である。従って、本実施形態のステップ S t 2 では、脱気したミリ Q 水に二酸化炭素を通気(バーリング)しているが、これに限られず、炭酸水素イオン (HCO^{3-}) 及び／又は炭酸イオン (CO_3^{2-}) が反応溶液中に添加される方法を用いればよい。例えば、炭酸ナトリウム (Na_2CO_3)、炭酸水素ナトリウム (NaHCO_3) 等の炭酸塩を、
10 ミリ Q 水に溶解して用いてよい。

本実施形態では、緩衝液としてHEPESとCAPSOとの混合溶液を用いている。しかし、これに限定されず、pHを調節するための手段は何であってもよい。例えば、1種類の緩衝剤を含む緩衝液を用いてもよく、複数種の緩衝剤の混合溶液を緩衝液として用いてよい。特に、複数種の緩衝剤の混合溶液を緩衝液として用いる方が、1種類
20 の緩衝剤を含む緩衝液を用いるよりも、反応溶液のpHの調節が容易になる。従って、複数の緩衝剤の混合溶液を緩衝液として用いることが好ましい。

ニッケル塩溶液は、本実施形態では硫酸ニッケルアンモニウム ($\text{NiNH}_3(\text{SO}_4)$) を用いている。しかし、これに限定されない。例えば、硫酸ニッケル ($\text{Ni}(\text{SO}_4)$)、硝酸ニッケル ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$)、塩化ニッケル (NiCl_2) を用いてよい。本実施形態では、反応溶液中にアンモニウムイオン (NH_4^+) が含まれている方が、反応収率の点からは望ましい。金属塩溶液として、金属塩アン

モニウム溶液を用いた場合、他の成分を反応溶液に添加することなく、反応溶液はアンモニウムイオンを含有することになる。

本実施形態では、反応溶液調製後の放置時間を 24 時間としたが、かかる時間に限定されず、各反応溶液の組成、pH 等に応じた最適時 5 間を選択することが望ましい。

本実施形態に示したナノ粒子の製造方法について、より具体的な反応溶液の条件等は、実施例の欄で後述する。

(実施形態 2)

本実施形態では、上記実施形態 1 において作製されたニッケル化合物ーアポフェリチン複合体を利用して作製されるナノ粒子からなるドット体をフローティングゲートとして含む不揮発性メモリセルについて説明する。

第 3 図 (a) ~ (d) は、本実施形態の不揮発性メモリセルの製造方法を示す工程断面図である。

まず、第 3 図 (a) に示す工程で、p 型 Si 基板 101 上に、LOCOS 法により、活性領域を取り囲む素子分離酸化膜 102 を形成した後、基板上にトンネル絶縁膜として機能するゲート酸化膜 103 を熱酸化法によって形成する。その後、6 nm 程度の直径を有するニッケルのナノ粒子からなるドット体 104 を基板上に形成する。なお、ドット体 104 を基板上に形成する方法については、後述する。

次に、第 3 図 (b) に示す工程で、基板上に、スパッタ法または CVD 法により、ドット体 104 を埋める SiO₂ 膜を堆積する。

次に、第 3 図 (c) に示す工程で、基板上に Al 膜を堆積する。続いて、フォトレジストマスク Pr1 を用いて、SiO₂ 膜および Al 膜のパターニングを行なって電極間絶縁膜となるシリコン酸化膜 105 及び制御ゲート電極となる Al 電極 106 を形成する。このとき、ゲート酸化膜 103 のうちフォトレジストマスク Pr1 で覆われていない部分は除去されるので、その上のドット体 104 も同時に除去

される。その後、フォトレジストマスク及びA 1 電極1 0 6をマスクとして不純物イオンの注入を行なって、第1、第2n型拡散層1 0 7a、1 0 7bを形成する。

その後、第3図(d)に示す工程で、周知の方法により、層間絶縁膜1 0 8の形成と、層間絶縁膜1 0 8へのコンタクトホール1 0 9の開口と、コンタクトホール1 0 9内へのタングステンの埋め込みによるタングステンプラグ1 1 0の形成と、第1、第2アルミニウム配線1 1 1a、1 1 1bの形成とを行なう。

本実施形態では、基板としてp型Si基板を用いたが、n型Si基板を用いてもよく、さらに、GaAsをはじめとする化合物半導体その他の半導体により構成される基板を用いてもよい。

次に、第3図(a)に示す工程において、ドット体1 0 4を基板上に形成する方法を、第4図および第5図を参照しながら以下に説明する。なお、本発明は、以下に説明する方法には限定されず、他の公知の方法を適用することも可能である。まず、第4図(a)に示す工程で、上記実施形態1で得られたニッケル化合物ーアポフェリチン複合体(以下、本実施形態では複合体と略す)1 5 0を用意し、この複合体1 5 0を基板1 3 0の表面上に配置する。このことによって、複合体1 5 0が基板1 3 0の表面上に高密度、且つ高精度で配置された複合体膜が形成される。なお、基板1 3 0とは、第3図(a)に示す工程で、p型Si基板1 0 1上に、LOCOS法により、活性領域を取り囲む素子分離酸化膜1 0 2を形成した後、基板上にトンネル絶縁膜として機能するゲート酸化膜1 0 3が熱酸化法によって形成されたものを指す。以下の説明においても同様である。

次に、第4図(b)に示す工程で、複合体1 5 0のうちのタンパク質分子1 4 0を除去して、ニッケル化合物のナノ粒子1 0 4aのみを残存させ、還元することによって、基板1 3 0上にニッケルのドット体1 0 4を形成する。

ここで、第4図(a)に示す工程において、複合体150を基板130の表面上に高密度、且つ高精度で配置する、すなわち、基板130の表面上に2次元状に配列および固定する方法について説明する。本実施形態では、特開平11-45990号公報に記載の方法を採用する。以下、かかる方法を、第5図を参照しながら説明する。

まず、第5図(a)に示す工程において、複合体150を分散した液体160(本実施形態では、濃度40mM、pH5.3のリン酸バッファ溶液と、濃度40mMの塩化ナトリウム水溶液との等量混合溶液にニッケル化合物ーアポフェリチン複合体を分散したもの)を用意する。

続いて、第5図(b)に示す工程において、PBLH(Poly-1-Benzyl-L-Histidine)を注射器などで静かに液体160の表面に展開する。このことによって、液体160の表面にPBLHからなるポリペプチド膜170が形成される。この後、液体160のpHを調節しておく。

次に、第5図(c)に示す工程において、時間の経過に伴って複合体150がポリペプチド膜170に付着し、複合体150の2次元結晶ができる。これは、ポリペプチド膜170が正電荷を帯びているのに対し、複合体150は負電荷を帯びているからである。

次に、第5図(d)に示す工程において、ポリペプチド膜170上に基板130を載置して(浮かべて)、ポリペプチド膜170を基板130に付着させる。

次に、第5図(e)に示す工程において、基板130を取り出せば、ポリペプチド膜170を介して、複合体150の2次元結晶が付着した基板130を得ることができる。

次に、第4図(b)に示す工程をさらに詳細に説明する。タンパク質分子は一般に熱に弱いため、複合体150のうちのタンパク質分子140の除去は、熱処理によって行なう。例えば、窒素等の不活性ガ

ス中において、400～500℃にて、約1時間静置すると、タンパク質分子140、およびポリペプチド膜170が焼失し、基板130上にはニッケルナノ粒子104aが2次元状に、高密度で、且つ高精度で規則正しく配列したドット体104として残存する。

- 5 以上のようにして、第4図(b)に示すように、複合体150に保持させたニッケルナノ粒子104aを、基板130上に2次元状に出
現させ、高密度且つ高精度に配列したドット体104を形成するこ
とができる。尚、タンパク質分子140を除去する方法として、本実施
形態においては熱処理を用いたが、かかる方法に限定されることはな
く、例えばタンパク質分解酵素や化学物質等を用いてタンパク質を分
解して消失させても良い。

第3図(d)に示すように、本実施形態のメモリセル100は、制御ゲートとして機能するA1電極106と、ソースまたはドレインとして機能する第1、第2n型拡散層107a、107bとからなるMOSトランジスタ(メモリセルトランジスタ)を備え、フローティングゲートとして機能するドット体104に蓄えられた電荷の量で上記メモリトランジスタの閾値電圧が変化することを利用した不揮発性メモリセルである。

この不揮発性メモリセルは、二値を記憶するメモリとしての機能が得られる。また、ニッケル、クロム及び銅は、表1に示すように、仕事関数が鉄やマンガン、コバルトなどと異なる。表1の仕事関数は、H. B. Michaelson "Work Functions of the elements" Journal of Applied Physics, pp536-540, volume 21, 1950. から引用した。

表 1

金属	仕事関数
Mn	4. 08
Zn	4. 33
Fe	4. 60
Co	4. 97
Ni	5. 22
Pt	5. 63
Cr	4. 50
Cu	4. 50

このため、これらのナノ粒子を組み合わせて利用することによって、
 5 電子を蓄え易さの差を利用して電子の蓄積を制御することが可能となる。従って、量子効果デバイスの設計に融通性を持たせることができる。

第6図は、互いに仕事関数が異なる化合物から形成された複数種類のドット体104がフローティングゲートとして形成されている以外、上記不揮発性メモリセル100と全く同じ構成を有する不揮発性メモリセル100'の上面図である。

第6図に示すように、互いに仕事関数が異なる化合物から形成された複数種類のドット体104をフローティングゲートとして形成することによって、ドット体104に蓄えられる電荷の有無のみでなく電荷の蓄積量を制御することができる3値以上の多値メモリ(不揮発性メモリセル100'は4値メモリ)を実現することもできる。

データの消去の際には、酸化膜を介したFN(Fowler-Nordheim)電流や直接トンネリング電流を利用する。

また、データの書き込みの際には、酸化膜を介したFN電流や直接

トンネリング電流あるいはチャネルホットエレクトロン（C H E）注入を用いる。

本実施形態の不揮発性メモリセルでは、フローティングゲートが量子ドットとして機能できる程度に粒径の小さいニッケルナノ粒子により構成されているので、電荷の蓄積量がわずかである。したがって、書き込み、消去の際の電流量を小さくでき、低消費電力の不揮発性メモリセルを構成することができる。

また、本実施形態の不揮発性メモリセルでは、フローティングゲートを構成するニッケルのドット体 104 のサイズが均一であるため、
10 電荷の注入、引き抜きの際の特性が各ニッケルのドット体 104 間で揃っており、これらの操作において制御が容易に行なえる。

実施例

（実施例 1：ニッケル化合物ーアポフェリチン複合体の作製）

本実施例では、まず、HEPES 緩衝液、CAPSO 緩衝液、市販
15 のアポフェリチン（ウマ脾臓由来）を溶解したアポフェリチン溶液、および硫酸ニッケルアンモニウム溶液の各溶液を調製した。各溶液の濃度および pH は、表 2 に示す通りである。各溶液を調製した後、直ちに HEPES 緩衝液および CAPSO 緩衝液の脱気を行った。

20 表 2

溶液 (pH)	濃度
HEPES 緩衝液 (pH 7.5)	500 mM
CAPSO 緩衝液 (pH 9.5)	500 mM
アポフェリチン溶液	55 mg / ml
硫酸ニッケルアンモニウム溶液	200 mM

次に、ミリ Q 水を用意し、ミリ Q 水中に二酸化炭素を 30 分間通気

(バブリング)することによって、二酸化炭素バブリング水を調製した。その後すぐに、二酸化炭素バブリング水に表2の各溶液を混合して、表3に示す組成の反応溶液を調製した。なお、ここでは3通りのCAPSO濃度を有する反応溶液を調製した。このことによって、3種類のpHの反応溶液を調製した。

表3

溶液 (pH)	濃度
HEPES	150 mM
CAPSO	235, 250, 265 mM
アポフェリチン	0.3 mg/ml
硫酸ニッケルアンモニウム	5 mM

10 本実施例では、表3に示す組成の各反応溶液を、総体積3mlとなるように調製したので、二酸化炭素バブリング水と表2の各溶液との添加量は、表4に示す通りであった。

表4

15

溶液 (濃度、pH)	濃度
二酸化炭素バブリング水	総体積が3mlとなるように添加
HEPES緩衝液(500mM pH7.5)	900 μl
CAPSO緩衝液(500mM pH9.5)	1410, 1500, 1590 μl
アポフェリチン溶液(55mg/ml)	16.35 μl
硫酸ニッケルアンモニウム溶液	75 μl

以上のようにして得られた3種類のpHの各反応溶液を、23°Cで

24時間放置した。その後、各反応溶液を8000Gで30分間遠心し、それぞれ上清を採取し、上清の状態を観察した。

次に、得られた各上清を水で3倍に薄め、2%金グルコースでアポフェリチンを染色し、透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて5万倍の5倍率で観察した。なお、2%金グルコースで染色した場合、アポフェリチン内の保持部に侵入することができないので、保持部が空洞であるアポフェリチンと、ニッケル化合物ーアポフェリチン複合体とを区別することができる。

各上清を透過型電子顕微鏡で観察したところ、いずれもドーナツ状10にタンパク質部分が白く、中心部が黒く見えるニッケル化合物のナノ粒子を内包したアポフェリチンが多数観察された。ニッケル化合物のナノ粒子は球状であり、その直径は6nm(標準偏差1nm)であった。すなわち、均一な粒径のナノ粒子が得られたといえる。

以上の観察結果を、CAPSO緩衝液の濃度とナノ粒子形成収率15(以下、YCFとも称す)との関係として表5に示す。尚、ナノ粒子形成収率(YCF)は、上清中のアポフェリチンのうち、ニッケル化合物のナノ粒子を内包したアポフェリチン(すなわち、ニッケル化合物ーアポフェリチン複合体)の割合とする。

20 表5

CAPSO濃度	235mM	250mM	265mM
pH	8.2	8.3	8.4
ナノ粒子形成収率	90%	100%	100%

一方、上記二酸化炭素バブリング水の代わりに、窒素バブリング水および酸素バブリング水を用い、他の条件は全く同様にした場合の結果をそれぞれ表6および表7に示す。表6は、窒素バブリング水を用25

いた場合の結果、表7は酸素バブリング水を用いた結果を示す。

表6

CAPSO濃度	235 mM	250 mM	265 mM
pH	8.2	8.3	8.4
ナノ粒子形成収率	0%	5%	20%

5

表7

CAPSO濃度	235 mM	250 mM	265 mM
pH	8.1	8.2	8.3
ナノ粒子形成収率	0%	5%	20%

これらの上清の状態を観察したところ、CAPSOの濃度が250
10 mMである反応溶液の上清は濁っており、CAPSOの濃度が265
mMである反応溶液の上清ではNi(OH)₂の沈殿が多数見られた。
従って、pH 8.3付近（酸素バブリング水を用いた場合はpH 8.
2付近）が、本実施例の反応溶液の組成でのNi(OH)₂の沈殿点
と考えられる。沈殿点より高いpHでは、ニッケルイオン(Ni²⁺)
がNi(OH)₂として高速に沈殿するので、かかる沈殿に伴い、多
くのアポフェリチンは凝集し沈殿してしまうと考えられる。一方、p
Hが低くなると、ナノ粒子を形成するために十分な水酸化物イオンが
溶液中に存在しないことになるので、ナノ粒子が形成されにくくなる
と考えられる。したがって、沈殿点付近のpHもしくは沈殿点よりわ
ずかに低いpHが効率良くナノ粒子を形成するための条件として好
ましいといえる。

表5～7の結果から、アポフェリチンを含む溶液において、沈殿点

付近の pHになるとニッケルイオンが化合物を形成する条件となるため、アポフェリチン内の保持部にナノ粒子が形成されると考えられる。しかし実際には、アポフェリチンの凝集沈殿を生じさせることなくナノ粒子を形成することは極めて困難である。

5 本実施例では、二酸化炭素バブリング水、窒素バブリング水および酸素バブリング水のいずれを用いた場合においても、沈殿点より高いpHであるC A P S O濃度が265mMの反応溶液の上清では、アポフェリチンが凝集沈殿していた。このため、ニッケル化合物ーアポフェリチン複合体を回収することが困難であり、工業的に利用するのは現実的ではないと考えられる。

ただし、表5～7に示すように、C A P S O濃度が265mMである反応溶液の上清では、二酸化炭素バブリング水を用いた場合のみ、ほぼ100%のアポフェリチンの保持部にナノ粒子が形成されていた。

15 さらに、二酸化炭素バブリング水を用いた場合、沈殿点よりもわずかに低いpH(C A P S O濃度が235mM、および250mMである反応溶液の上清)でも、大半のアポフェリチンの保持部にニッケル化合物のナノ粒子が形成されており、アポフェリチンの凝集沈殿も抑制されていた。

20 それに対して、窒素バブリング水および酸素バブリング水を用いた場合では、沈殿点付近若しくは沈殿点よりもわずかに低いpH(C A P S O濃度が235mM、および250mMである反応溶液の上清)で、大半のアポフェリチンの保持部にナノ粒子が形成されていなかつた。

25 つまり、アポフェリチンの凝集を抑えながら、アポフェリチンの保持部にナノ粒子を形成することができるのは二酸化炭素バブリング水を用いた場合のみであった。

(実施例2：ニッケル化合物ーアポフェリチン複合体の作製に際す

るニッケル塩の陰イオンの種類の影響を調べる試験)

本実施例では、まず、HEPES緩衝液、CAPSO緩衝液、市販のアポフェリチン（ウマ脾臓由来）を溶解したアポフェリチン溶液、およびニッケル塩溶液（硫酸ニッケル溶液、硝酸ニッケル溶液および5 塩化ニッケル溶液）の各溶液を調製した。各溶液の濃度およびpHは、表8に示す通りである。各溶液を調製した後、直ちにHEPES緩衝液およびCAPSO緩衝液の脱気を行った。

表8

10

溶液 (pH)	濃度
HEPES緩衝液 (pH 7.5)	500 mM
CAPSO緩衝液 (pH 9.5)	500 mM
アポフェリチン溶液	55 mg / ml
ニッケル塩溶液	200 mM

次に、ミリQ水を用意し、ミリQ水中に二酸化炭素を30分間通気(バーリング)することによって、二酸化炭素バーリング水を調製した。その後すぐに、二酸化炭素バーリング水に表8の各溶液を混合して、表9に示す組成の反応溶液を調製した。なお、ここでは3通りのCAPSO濃度を有する反応溶液を調製した。このことによって、3種類のpHの反応溶液を調製した。

表 9

溶液 (pH)	濃度
HEPES	150 mM
CAPSO	140, 150, 160 mM
アポフェリチン	0.3 mg/ml
硫酸ニッケルアンモニウム	5 mM

5 本実施例では、表 9 に示す組成の各反応溶液を、総体積 3 ml となるように調製したので、二酸化炭素バブリング水と表 8 の各溶液との添加量は、表 10 に示す通りであった。

表 10

溶液 (濃度、pH)	濃度
二酸化炭素バブリング水	総体積が 3 ml となるように添加
HEPES 緩衝液 (500 mM pH7.5)	900 μl
CAPSO 緩衝液 (500 mM pH9.5)	840, 900, 960 μl
アポフェリチン溶液 (55 mg/ml)	16.35 μl
ニッケル塩溶液 (200 mM)	75 μl

10

以上のようにして得られた 3 種類の pH の各反応溶液を、23 °C で 24 時間放置した。その後、各反応溶液を 8000 G で 30 分間遠心し、それぞれ上清を採取し、上清の状態を観察した。CAPSO 濃度が 160 mM である反応溶液の各上清 (pH 8.24) は、わずかに濁っており、pH 8.2 付近が本実施例の反応溶液の組成での Ni(OH)₂ の沈殿点であると考えられた。

次に、得られた各上清を水で 3 倍に薄め、2 % 金グルコースでアボ

フェリチンを染色し、透過型電子顕微鏡（TEM）を用いて5万倍の倍率で観察した。なお、2%金グルコースで染色した場合、アポフェリチン内の保持部に侵入する事がないので、保持部が空洞であるアポフェリチンと、ニッケル化合物ーアポフェリチン複合体とを区別することができる。

各上清を透過型電子顕微鏡で観察した結果を第7図（a）～（c）に示す。第7図（a）～（c）に示すように、いずれもドーナツ状にタンパク質部分が白く、中心部が黒く見えるニッケル化合物のナノ粒子を内包したアポフェリチンが観察された。いずれの上清においても、ニッケル化合物のナノ粒子は球状であり、その直径は6 nm（標準偏差1 nm）であった。すなわち、均一な粒径のナノ粒子が得られたといえる。

以上の観察結果を、CAPSO濃度と使用するニッケル塩毎のナノ粒子形成収率（YCF）との関係として表11に示す。

15

表11

CAPSO濃度	ナノ粒子形成収率（%）		
	硫酸ニッケル	硝酸ニッケル	塩化ニッケル
140mM(pH8.14)	40-50	30-40	50-60
160mM(pH8.19)	100	100	100
180mM(pH8.24)	100	100	100

表11からわかるように、本実施例の反応溶液の組成でのNi(OH)₂の沈殿点であるpH8.2付近で、ほぼ100%のアポフェリチンの保持部にニッケル化合物のナノ粒子が形成された。また、CAPSO濃度が140mMである反応溶液の各上清（pH8.14）においても、ナノ粒子形成収率が低下しているものの、アポフェリチン

の保持部にニッケル化合物のナノ粒子が形成されたことがわかる。

本実施例の結果と、上記実施例1の結果とから、アポフェリチンの保持部にニッケル化合物のナノ粒子を効率良く形成させるためには、
Ni(OH)₂の沈殿点付近若しくは沈殿点よりもわずかに低いpH
5 が適していると考えられる。

さらに、本実施例の結果から、ナノ粒子形成収率は、ニッケル塩の陰イオンの種類によらずほぼ同じであり、ナノ粒子形成にニッケル塩の陰イオンが影響しないことがわかる。

(実施例3：ニッケル化合物ーアポフェリチン複合体の作製に際するpH、硫酸ニッケルアンモニウム溶液濃度、放置時間の最適条件を検索する試験)

本実施例では、まず、HEPES緩衝液、CAPSO緩衝液、市販のアポフェリチン（ウマ脾臓由来）を溶解したアポフェリチン溶液、および硫酸ニッケルアンモニウム溶液の各溶液を調製した。各溶液の濃度及びpHは、表12に示す通りである。各溶液を調製した後、直ちにHEPES緩衝液およびCAPSO緩衝液の脱気を行った。

表12

溶液 (pH)	濃度
HEPES緩衝液 (pH 7.5)	500 mM
CAPSO緩衝液 (pH 9.5)	500 mM
アポフェリチン溶液	55 mg / ml
硫酸ニッケルアンモニウム溶液	200 mM

次に、ミリQ水を用意し、ミリQ水中に二酸化炭素を30分間通気（バーリング）することによって、二酸化炭素バーリング水を調製した。その後すぐに、二酸化炭素バーリング水に上記の各溶液を混合し

て、表13に示す組成1～12の12種類の反応溶液を総体積が3mLとなるように調製した。

表13

5

	HEPES (mM)	CAPS0 (mM)	アホーフエリチン (mg/ml)	硫酸ニッケルアンモニウム (mM)
組成1	150	220	0.3	2
組成2	150	240	0.3	2
組成3	150	260	0.3	2
組成4	150	220	0.3	3
組成5	150	240	0.3	3
組成6	150	260	0.3	3
組成7	150	220	0.3	5
組成8	150	240	0.3	5
組成9	150	260	0.3	5
組成10	150	220	0.3	10
組成11	150	240	0.3	10
組成12	150	260	0.3	10

以上のようにして得られた12種類の組成の各反応溶液を、23℃で0, 8, 16, 24, 32, 40, 48時間放置した。各試料のpHは、表14に示す通りであり、これらのpHは48時間放置後にも変化なかった。

10

表 1 4

	溶液 pH
組成 1	8. 7 4
組成 2	8. 8 2
組成 3	8. 9 3
組成 4	8. 4 8
組成 5	8. 5 8
組成 6	8. 7 3
組成 7	8. 3 2
組成 8	8. 4 2
組成 9	8. 5
組成 10	8. 1 4
組成 11	8. 1 5
組成 12	8. 1 6

所定時間放置後、各反応溶液を 8000G で 10 分間遠心し、それ
5 ぞれ上清を採取し、上清の状態を観察した。

まず、得られた上清のアポフェリチン濃度をプロテインアッセーキット（バイオラド社製）を用いて定量した。

次に、得られた各上清を水で 3 倍に薄め、2% 金グルコースでアポ
10 フェリチンを染色し、透過型電子顕微鏡（TEM）を用いて 5 万倍の
倍率で観察した。なお、2% 金グルコースで染色した場合、アポフェリチン内
の保持部に侵入する事がないので、保持部が空洞であるアポフェリチンと、ニッケル化合物－アポフェリチン複合体とを区別す
ることができる。ニッケル化合物－アポフェリチン複合体は、タンパ
ク質部分がドーナツ状に白く、ニッケル化合物のナノ粒子を内包した
15 中心部が黒く見えた。

以上の観察結果を、放置時間とアポフェリチン濃度との関係（実線）及び放置時間とナノ粒子形成収率（YCF）との関係（点線）として第8図（a）～（d）に示す。なお、第8図（a），（b），（c），（d）はそれぞれ、硫酸ニッケルアンモニウムの濃度が2，3，5，10 mMの場合を示す。CAPSO濃度が260 mMである溶液（組成物3，6，9，12）はいずれも8時間放置後にほとんど全てのアポフェリチンが沈殿し、上清中のアポフェリチン濃度はほぼ0となつたので、第8図中では、この溶液の結果を省略することとする。従つて、第8図（a）は試料1，2、（b）は試料4，5、（c）は試料7，8、（d）は試料10，11の結果を示す。

上記結果からわかるように、硫酸ニッケルアンモニウム濃度が2，3，5，10 mMである場合のそれぞれのNi(OH)₂の沈殿点のpHは、8.82，8.58，8.42，8.15付近であった。

次に、上記観察結果を、硫酸ニッケルアンモニウム濃度とナノ粒子形成効率（ECF）との関係（実線）及び硫酸ニッケルアンモニウム濃度と沈殿点のpHとの関係（点線）として第9図に示す。ナノ粒子形成効率（ECF）は、最初（溶液調製時）に添加したアポフェリチンのうち、上清におけるナノ粒子を内包したアポフェリチン（ニッケル化合物－アポフェリチン複合体）の割合とする。

第9図に示す結果より、ナノ粒子形成効率（ECF）は、16時間以上放置した場合は、硫酸ニッケルアンモニウムの濃度が3 mM付近で最大値を示す。16時間の放置が最も高いナノ粒子形成効率（ECF）を示すが、この条件でのナノ粒子形成収率（YCF）は、第8図からわかるようにいずれの硫酸ニッケルアンモニウムの濃度においても100%ではない。ナノ粒子形成収率（YCF）が100%でない場合、上清中にナノ粒子を内包しているアポフェリチンと、ナノ粒子を内包していないアポフェリチンとが存在することになり、これらを分離するためのさらなる精製工程が必要となる。したがって、硫酸

ニッケルアンモニウムの濃度が 3 mM、pH が 8.5~8 付近であって、溶液調製後の放置時間を 2~4 時間とした条件が、形成効率及び精製効率の観点からニッケル化合物ーアポフェリチン複合体を製造するための最適条件であると考える。

5 (実施例 4 : ニッケル化合物ーアポフェリチン複合体の作製に際するアンモニウムイオンの影響を調べる試験)

本実施例では、まず、HEPES 緩衝液、CAPSO 緩衝液、市販のアポフェリチンを溶解したアポフェリチン溶液、アンモニア水、および硫酸ニッケルアンモニウム溶液の各溶液を調製した。各溶液の濃度および pH は、表 15 に示す通りである。各溶液を調製した後、直ちに HEPES 緩衝液および CAPSO 緩衝液の脱気を行った。

表 15

溶液 (pH)	濃度
HEPES 緩衝液 (pH 7.5)	500 mM
CAPSO 緩衝液 (pH 9.5)	500 mM
アポフェリチン溶液	55 mg / ml
アンモニア水	1000 mM
ニッケル塩溶液	200 mM

15

次に、ミリQ 水を用意し、ミリQ 水中に二酸化炭素を 30 分間通気 (バーリング) することによって、二酸化炭素バーリング水を調製した。その後すぐに、二酸化炭素バーリング水に表 15 の各溶液を混合して、反応溶液を調製した。また、同時に二酸化炭素を通気せず、脱氣しただけの水 (脱気水) を、二酸化炭素バーリング水の代わりに加えた反応溶液も調製した。反応溶液の組成を表 16 に示す。

表 1 6

溶液 (pH)	濃度
HEPES	150 mM
CAPSO	210 mM
アポフェリチン	0.3 mg/ml
NH ⁴⁺ (アンモニア水により供給され)	20 mM
硫酸ニッケルアンモニウム溶液	5 mM

本実施例においては、表 1 6 に示す組成の反応溶液を、総体積 3 ml となるように溶液を調製したので、表 1 5 の各溶液と二酸化炭素バブリング水または脱気水との添加量は、表 1 7 に示す通りである。

表 1 7

溶液 (pH)	濃度
二酸化炭素バブルリング水又は脱気	総体積が 3 ml となるように添加
HEPES 緩衝液 (500 mM pH7.5)	900 μl
CAPSO 緩衝液 (500 mM pH9.5)	1260 μl
アポフェリチン溶液 (55 mg/ml)	16.35 μl
アンモニア水	60 μl
硫酸ニッケルアンモニウム溶液 (200 mM)	75 μl

10

以上のようにして得られた各反応溶液を、23℃で 24 時間放置した。その後、各反応溶液を 8000 G で 30 分間遠心し、それぞれ上清を採取し、上清の状態を観察した。

次に、得られた各上清を水で 3 倍に薄め、2% 金グルコースでアポフェリチンを染色し、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて 5 万倍の

倍率で観察した。なお、2%金グルコースで染色した場合、アポフェリチン内の保持部に侵入することができないので、保持部が空洞であるアポフェリチンと、ニッケル化合物ーアポフェリチン複合体とを区別することができる。

5 二酸化炭素バブリング水を用いた反応溶液の上清を透過型電子顕微鏡で観察した結果を第10図(a)に示す。第10図(a)に示すように、ドーナツ状にタンパク質部分が白く、中心部が黒く見えるニッケル化合物のナノ粒子を内包したアポフェリチンが観察された。

二酸化炭素バブリング水を用いた反応溶液の上清のpHをさらに10 調節し、沈殿点を探査した結果、 Ni(OH)_2 の沈殿点はpH 8.65であった。上記実施例1～3に比べて沈殿点のpHが上昇した理由は、アンモニウムイオンがニッケルイオン(Ni^{2+})と錯体を形成し、ニッケルイオン(Ni^{2+})を保護するためだと考えられる。この沈殿点のpH 8.65からやや低いpH範囲がニッケル化合物のナノ粒子を形成する最適なpH範囲である。二酸化炭素バブリング水を用いた反応溶液の上清が、上記最適なpH範囲にあるとき、アポフェリチンの凝集は抑えられており、アポフェリチンの保持部にニッケル化合物のナノ粒子が形成されていることを確認できた。

二酸化炭素バブリング水を用いた反応溶液の上清のpHが沈殿点のpH 8.65よりも上昇すると、アポフェリチンが凝集し、工業的に利用することが困難になる。また、二酸化炭素バブリング水を用いた反応溶液の上清のpHがナノ粒子を形成する最適なpH範囲よりも低くなるにつれて、ナノ粒子の形成は減少し、pH 8.3ではナノ粒子の形成を確認できなかった。

25 一方、脱気水を用いた反応溶液の上清を透過型電子顕微鏡で観察した結果を第10図(b)に示す。第10図(b)に示すように、ドーナツ状にタンパク質部分が白く、中心部が黒く見えるニッケル化合物のナノ粒子を内包したアポフェリチンが観察されなかった。また、脱

気水を用いた反応溶液の上清の pH を様々に変化させても結果は同じであった。ナノ粒子が形成されない原因是、アンモニウムイオンの影響であると考えられるが、そのメカニズムは不明である。

いずれにせよ、本実施例では、反応溶液中に存在するアンモニウムイオンがニッケルイオン (Ni^{2+}) と錯体を形成することによって安定化するため、 $Ni(OH)_2$ の沈殿点の pH が高くなっている。反応溶液中に炭酸イオン及び／又は炭酸水素イオンが存在することがナノ粒子の形成のために重要であることと、反応溶液の pH を $Ni(OH)_2$ の沈殿点の pH よりもわずかに低い pH に保つことがナノ粒子の形成に適していることは、上記実施例 1～3 と共通している。

(実施例 5：ニッケル化合物－アポフェリチン複合体の作製に際するアンモニウムイオンの最適濃度を検索する試験)

本実施例では、まず、HEPES 緩衝液、CAPSO 緩衝液、市販のアポフェリチン（ウマ脾臓由来）を溶解したアポフェリチン溶液、アンモニア水、および硫酸ニッケルアンモニウム溶液の各溶液を調製した。各溶液の濃度および pH は、表 18 に示す通りである。各溶液を調製した後、直ちに HEPES 緩衝液および CAPSO 緩衝液の脱気を行った。

20 表 18

溶液 (pH)	濃度
HEPES 緩衝液 (pH 7.5)	500 mM
CAPSO 緩衝液 (pH 9.5)	500 mM
アポフェリチン溶液	55 mg / ml
アンモニア水	1000 mM
硫酸ニッケルアンモニウム溶液	200 mM

次に、ミリQ水を用意し、ミリQ水中に二酸化炭素を30分間通気(バーリング)することによって、二酸化炭素バーリング水を調製した。その後すぐに、二酸化炭素バーリング水に表18の各溶液を、表19に示す組成の総体積3mLの反応溶液となるように混合した。

5

表19

溶液 (pH)	濃度
HEPES	150 mM
CAPSO	150 ~ 300 mM
アポフェリチン	0.3 mg/mL
NH ⁴⁺ (アンモニア水により供給された)	0, 10, 20, 30 mM
硫酸ニッケルアンモニウム溶液	5 mM

以上のようにして得られた各反応溶液を、23℃で48時間放置し
10 た。その後、各反応溶液を8000Gで30分間遠心し、それぞれ上清を採取し、上清の状態を観察した。

次に、得られた各上清を水で3倍に薄め、2%金グルコースでアポ
15 フェリチンを染色し、透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて5万倍の
倍率で観察した。なお、2%金グルコースで染色した場合、アポフェ
リチン内の保持部に侵入する事がないので、保持部が空洞であるア
ポフェリチンと、ニッケル化合物ーアポフェリチン複合体とを区別す
ることができる。

以上の観察結果を、反応溶液の上清のpHに対するナノ粒子形成收
率(YCF)を第11図(a)に、ナノ粒子形成効率(ECF)を第
20 11図(b)に示す。それぞれの溶液の沈澱点はアンモニア水を添加
していない溶液ではpH8.42、アンモニウムイオン(以下、本実
施例におけるアンモニウムイオンとはアンモニア水により供給され

たものをいう) 10 mMではpH 8.58、アンモニウムイオン20 mMではpH 8.65、アンモニウムイオン30 mMではpH 8.92付近であった。

以上からわかるように、アンモニウムイオンの添加濃度に応じて沈澱点のpHは大きくなる。この理由は、実施例4でも解析したように、アンモニウムイオンがニッケルイオン(Ni^{2+})と錯体を形成し、ニッケルイオン(Ni^{2+})を保護するためだと考えられる。アンモニウムイオンの濃度の異なる各溶液においては、かかる沈殿点のpH付近もしくは沈澱点よりわずかに低いpHがナノ粒子を形成する最適なpH範囲である。二酸化炭素バーリング水を用いた反応溶液の上清が、上記最適なpH範囲にあるとき、アポフェリチンの凝集は抑えられており、またアポフェリチンの保持部にニッケル化合物のナノ粒子が形成されていることを確認できた。

第11図(b)からわかるように、ナノ粒子形成効率(ECF)は、アンモニア水の濃度が20 mMの溶液において最も高く、沈澱点付近のpHでは100%であった。ナノ粒子形成効率(ECF)が100%ということは、溶液中に添加した全てのアポフェリチンがその保持部内にナノ粒子を形成しているということである。アンモニア水を添加していない実施例3ではナノ粒子形成効率(ECF)はいずれの条件においても100%に到達しなかったので(第9図参照)、アンモニウムイオンの添加により、ナノ粒子をより収率良く形成することができるようになったことがわかる。特に、本実施例の組成においては、アンモニウムイオンが20 mMとなるように添加された場合、ナノ粒子の収率が最も良い。尚、アンモニア水の添加にかかわらず、ナノ粒子形成効率(YCF)はそれぞれの沈澱点付近のpHで100%が得られた。

本実施例では、適切な濃度のアンモニウムイオンの添加により、高い値のナノ粒子形成効率(ECF)が得られる。尚、反応溶液中に炭

酸イオン及び／又は炭酸水素イオンが存在することがナノ粒子の形成のために重要であることと、反応溶液の pH を Ni(OH)₂ の沈殿点の pH もしくはこれよりもわずかに低い pH に保つことがナノ粒子の形成に適していることは、上記実施例 1～4 と共通している。

5 (実施例 6：クロム化合物ーアポフェリチン複合体の作製)

本実施例では、まず、HEPES 緩衝液、MES 緩衝液、遺伝子工学的に作製した L 鎮のみのアポフェリチンを溶解した L 鎮アポフェリチン溶液、および硫酸クロムアンモニウム溶液の各溶液を調製した。各溶液の濃度および pH は、表 20 に示す通りである。なお、各溶液 10 を調製した後、直ちに HEPES 緩衝液および MES 緩衝液の脱気を行った。

表 20

溶液 (pH)	濃度
HEPES 緩衝液 (pH 7.5)	5.00 mM
MES 緩衝液 (pH 5.5)	5.5 mM
L 鎮アポフェリチン溶液	5.5 mg/ml
硫酸クロムアンモニウム溶液	2.00 mM

15

次に、ミリ Q 水を用意し、ミリ Q 水中に二酸化炭素を 30 分間通気 (バーリング) することによって、二酸化炭素バーリング水を調製した。その後すぐに、二酸化炭素バーリング水に表 20 の各溶液を混合して、表 21 に示す組成の反応溶液を調製した。

20

表 2 1

溶液 (pH)	濃度
HEPES	150 mM
MES	210 mM
L鎖アポフェリチン	0.1 mg/ml
硫酸クロムアンモニウム	5 mM

本実施例では表 2 1 に示す組成の各反応溶液を、総体積 3 ml となるように調製したので、二酸化炭素バブリング水と表 2 0 の各溶液との添加量は、表 2 2 に示す通りである。

表 2 2

溶液 (濃度、pH)	濃度
二酸化炭素バブリング水	総体積が 3 ml となるように添加
HEPES 緩衝液 (500mM pH7.5)	900 μl
MES 緩衝液 (500mM pH5.5)	12.60 μl
L鎖アポフェリチン溶液 (27.5mg/ml)	16.35 μl
硫酸クロムアンモニウム溶液 (200mM)	75 μl

10 以上のようにして得られた反応溶液を、23℃で24時間放置した。その後、各反応溶液を8000Gで30分間遠心し、それぞれ上清を採取し、上清の状態を観察した。

15 次に、得られた各上清を水で3倍に薄め、2%金グルコースでアポフェリチンを染色し、透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて5万倍の倍率で観察した。なお、2%金グルコースで染色した場合、アポフェリチン内の保持部に侵入する事がないので、保持部が空洞であるアポフェリチンと、クロム化合物のナノ粒子を内包したアポフェリチン

(すなわち、クロム化合物ーアポフェリチン複合体)とを区別することができる。

各上清を透過型電子顕微鏡で観察したところ、いずれもドーナツ状にタンパク質部分が白く、中心部が黒く見えるクロム化合物のナノ粒子を内包したアポフェリチンが多数観察された。クロム化合物のナノ粒子は球状であり、その直径は 6 nm (標準偏差 1 nm) であった。すなわち、均一な粒径のナノ粒子が得られたといえる。

反応溶液を Cr (OH)₂ の沈殿点付近の pH としているため、反応溶液の上清はわずかに濁っていた。上清を透過型電子顕微鏡で観察したところ、ドーナツ状にタンパク質部分が白く、中心部が黒く見えるクロム化合物のナノ粒子を内包したアポフェリチンが観察された。

本実施例の条件では、上清中約 50 % のアポフェリチン内にクロム化合物のナノ粒子を確認した。すなわち、ナノ粒子形成収率 (YCF) が約 50 % であった。二酸化炭素バブリング水のかわりに、脱気水を用いたこと以外同じ条件の反応溶液でクロム化合物のナノ粒子の作製を試みたが、クロム化合物のナノ粒子の形成を確認することはできなかった。

(実施例 7 : 銅化合物ーアポフェリチン複合体の作製)

本実施例では、まず、MES 緩衝液、市販のアポフェリチン (ウマ脾臓由来) を溶解したアポフェリチン溶液、および硫酸銅アンモニウム溶液の各溶液を調製した。各溶液の濃度および pH は、表 2 3 に示す通りである。なお、各溶液を調製した後、直ちに MES 緩衝液の脱気を行った。

表 2 3

溶液 (pH)	濃度
MES 緩衝液 (pH 6.0)	500 mM
アポフェリチン溶液	5 mg / m l
硫酸銅アンモニウム溶液	10 mM

5 次に、ミリQ水を用意し、ミリQ水中に二酸化炭素を 30 分間通気
 (バーリング) することによって、二酸化炭素バーリング水を調製した。その後すぐに、二酸化炭素バーリング水に表 2 3 の各溶液を混合して、表 2 4 に示す組成の反応溶液を調製した。

表 2 4

溶液 (pH)	濃度
MES	100 mM
アポフェリチン	0.15 mg / m l
硫酸銅アンモニウム	1.2 mM

本実施例では、表 2 3 に示す組成の各反応溶液を、総体積 3 m l となるように調製したので、二酸化炭素バーリング水と表 2 3 の各溶液との添加量は、表 2 5 に示す通りである。

表 25

溶液 (濃度、 pH)	濃度
二酸化炭素バブリング水	総体積が 3 m l となるように添加
M E S 緩衝液 (500mM pH6.0)	6 0 0 μ l
アポフェリチン溶液 (5mg/ml)	9 0 μ l
硫酸銅アンモニウム溶液 (10mM)	3 6 0 μ l

以上のようにして得られた反応溶液を、23℃で24時間放置した。

5 その後、各反応溶液を8000Gで30分間遠心し、それぞれ上清を採取し、上清の状態を観察した。

次に、得られた各上清を水で3倍に薄め、2%金グルコースでアポフェリチンを染色し、透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて5万倍の倍率で観察した。なお、2%金グルコースで染色した場合、アポフェリチン内の保持部に侵入することができないので、保持部が空洞であるアポフェリチンと、銅化合物のナノ粒子を内包したアポフェリチン(すなわち、銅化合物ーアポフェリチン複合体)とを区別することができる。

各上清を透過型電子顕微鏡で観察したところ、いずれもドーナツ状にタンパク質部分が白く、中心部が黒く見える銅化合物のナノ粒子を内包したアポフェリチンが多数観察された。銅化合物(Cu(OH)₂)のナノ粒子は球状であり、その直径は6nm(標準偏差1nm)であった。すなわち、均一な粒径のナノ粒子が得られたといえる。

反応溶液を銅化合物(Cu(OH)₂)の沈殿点付近のpHとしているため、反応溶液の上清はわずかに濁っていた。上清を透過型電子顕微鏡で観察したところ、ドーナツ状にタンパク質部分が白く、中心部が黒く見える銅化合物のナノ粒子を内包したアポフェリチンが観察された。

本実施例の条件では、上清中約30～40%のアポフェリチン内に銅化合物のナノ粒子を確認した。すなわち、ナノ粒子形成収率(YCF)が約30～40%であった。

以上説明したように、本発明によると、均一な粒子径を有するナノ粒子を得ることができる。また、本発明によると、これまでタンパク質空洞部内の粒子形成が報告されていなかった金属イオンについても、タンパク質空洞部内でその化合物粒子を得ることができ、さらにそれらの金属イオンからなる均一な粒子径を有するナノ粒子を得ることができる。

10 [産業上の利用可能性]

本発明によると、均一な粒子径を有するナノ粒子を提供することができる。本発明により提供されるナノ粒子は、これらの量子効果を利用して、半導体素子、単電子デバイス、量子ドット、発光素子等へ利用することができる。

15 また、本発明により提供されるナノ粒子は、光機能コーティング材、電磁波遮蔽材料、二次電池用材料、蛍光材料、電子部品材料、磁気記録材料、研磨材料、化粧品材料等の高機能、高性能、高密度、高度精密化材料として利用することができる。

請求の範囲

1. 内部に空洞部を有するタンパク質、金属イオン、炭酸イオン及び／又は炭酸水素イオンを含む溶液中で、該タンパク質の空洞部内に該金属イオンの化合物からなるナノ粒子を形成させる工程を含む、ナノ粒子の製造方法。
5
2. 前記化合物が水酸化物である、請求の範囲第1項に記載のナノ粒子の製造方法。
10
3. 前記金属イオンが、ニッケルイオン (Ni^{2+})、クロムイオン (Cr^{2+}) または銅イオン (Cu^{2+}) のいずれかである、請求の範囲第2項に記載のナノ粒子の製造方法。
- 15 4. 前記金属イオンがニッケルイオンである、請求の範囲第3項に記載のナノ粒子の製造方法。
5. 前記金属イオンがクロムイオンである、請求の範囲第3項に記載のナノ粒子の製造方法。
20
6. 前記金属イオンが銅イオンである、請求の範囲第3項に記載のナノ粒子の製造方法。
...
25
7. 前記溶液の pH が前記金属イオンの水酸化物の沈殿点とほぼ同じである、請求の範囲第2項に記載のナノ粒子の製造方法。
8. 前記溶液の pH が 8 以上 9 以下である、請求の範囲第4項に記載のナノ粒子の製造方法。

9. 前記溶液が、さらにアンモニウムイオンを含む、請求の範囲第4項に記載のナノ粒子の製造方法。

10. 前記溶液のpHが8.3を越えて8.65以下である、請求の範囲第9項に記載のナノ粒子の製造方法。

11. 前記タンパク質が、アポフェリチン、Dpsタンパク質、CMVタンパク質、TMVタンパク質またはヒートショックプロテインの少なくとも一つである、請求の範囲第1項に記載のナノ粒子の製造方法。

12. 前記溶液が、それに二酸化炭素を通気することによって生成した炭酸イオン及び／又は炭酸水素イオンを含む、請求の範囲第1項に記載のナノ粒子の製造方法。

15

13. 前記ナノ粒子を形成した後、タンパク質を熱処理によって除去する工程をさらに含む、請求の範囲第1項に記載のナノ粒子の製造方法。

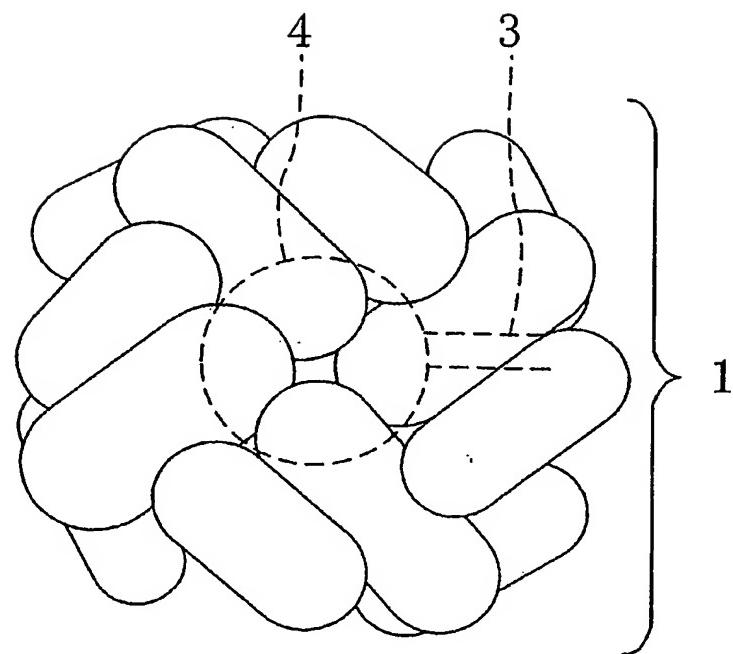
14. 金属イオンの化合物からなるナノ粒子であって、内部に空洞部を有するタンパク質、該金属イオン、炭酸イオン及び／又は炭酸水素イオンを含む溶液中で、該タンパク質の空洞部内に形成されたナノ粒子。

15. 内部に空洞部を有するタンパク質と、該タンパク質の空洞部内に形成されたナノ粒子とからなる複合体であって、

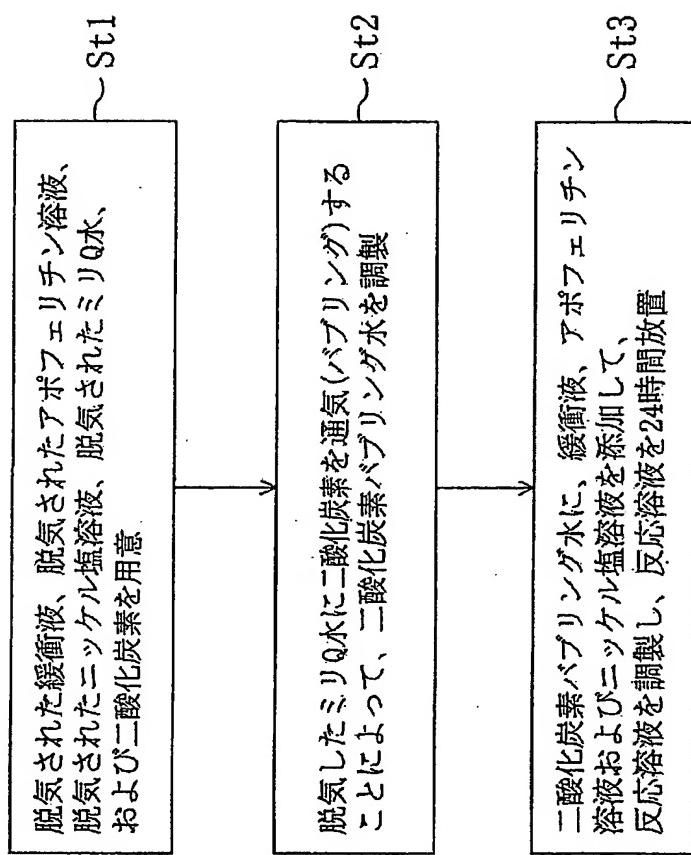
前記ナノ粒子は、金属イオンの化合物からなるナノ粒子であって、該タンパク質、該金属イオン、炭酸イオン及び／又は炭酸水素イオン

を含む溶液中で、該タンパク質の空洞部内に形成されたナノ粒子である、複合体。

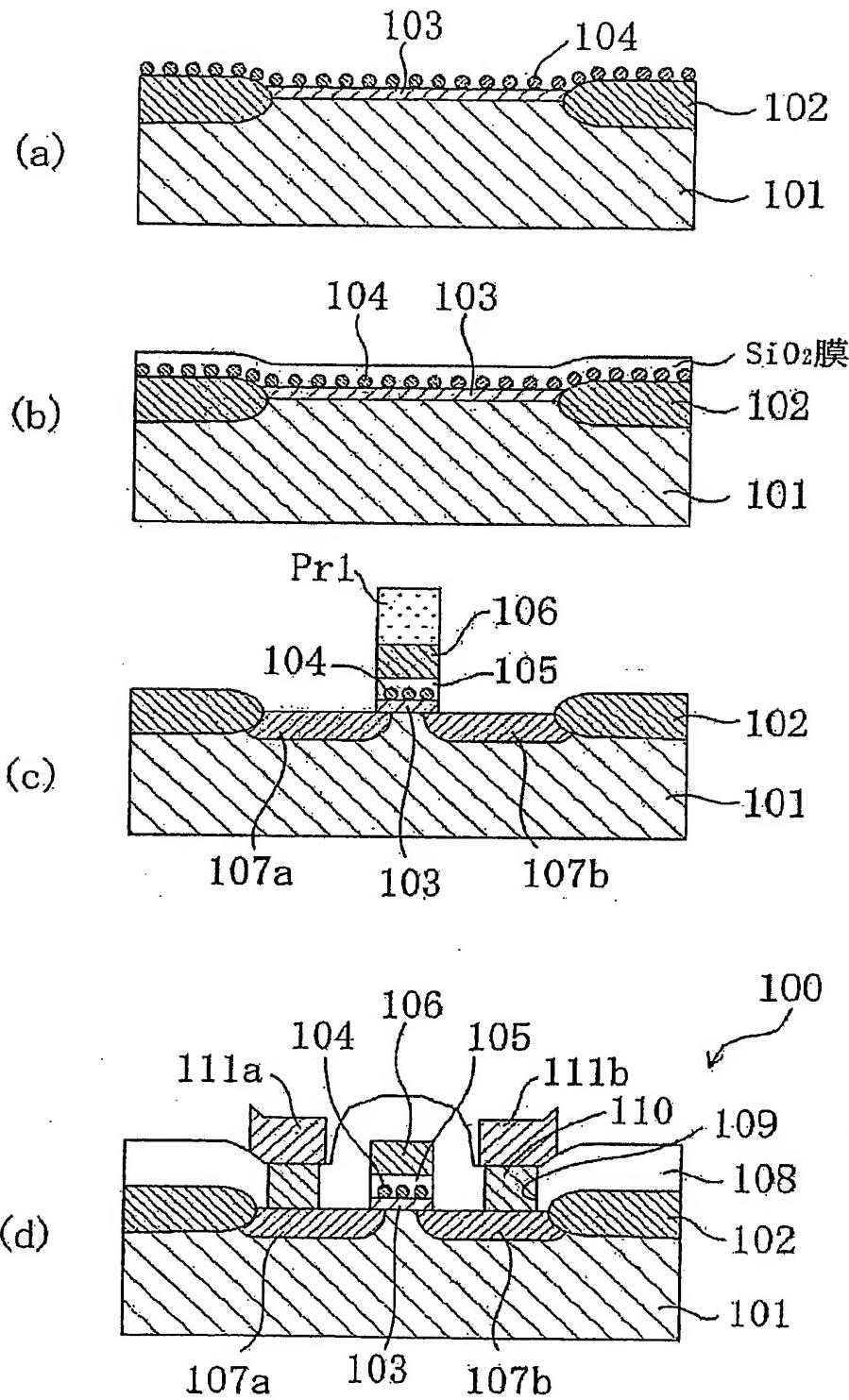
第1図



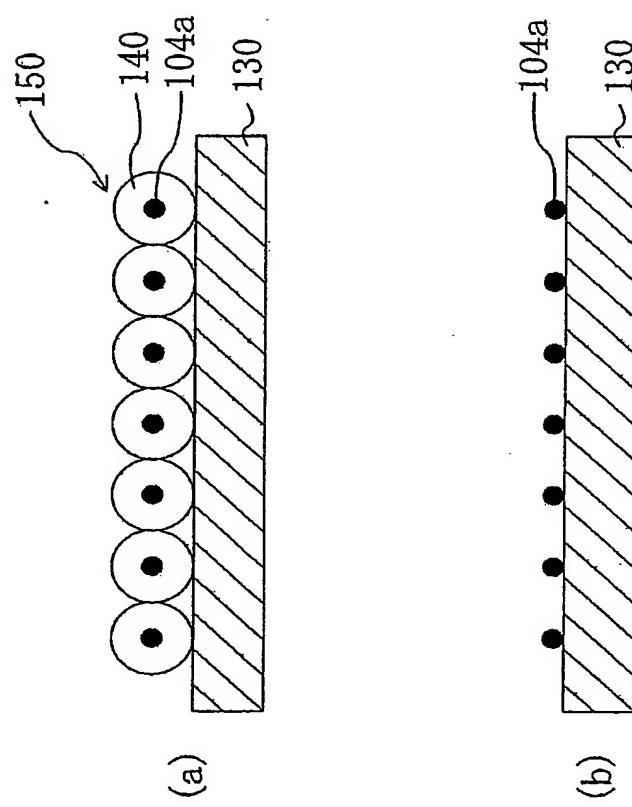
第2図



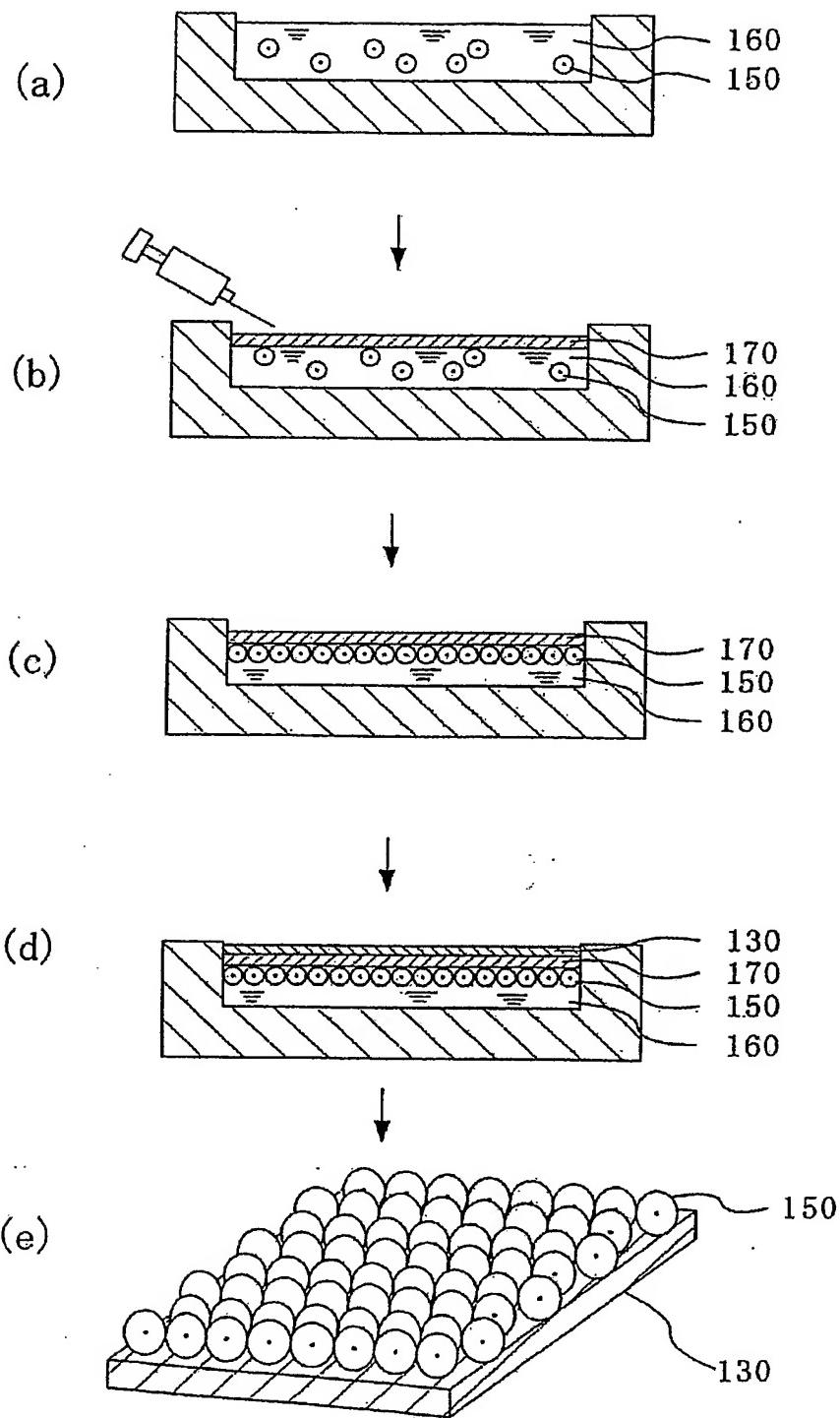
第3図



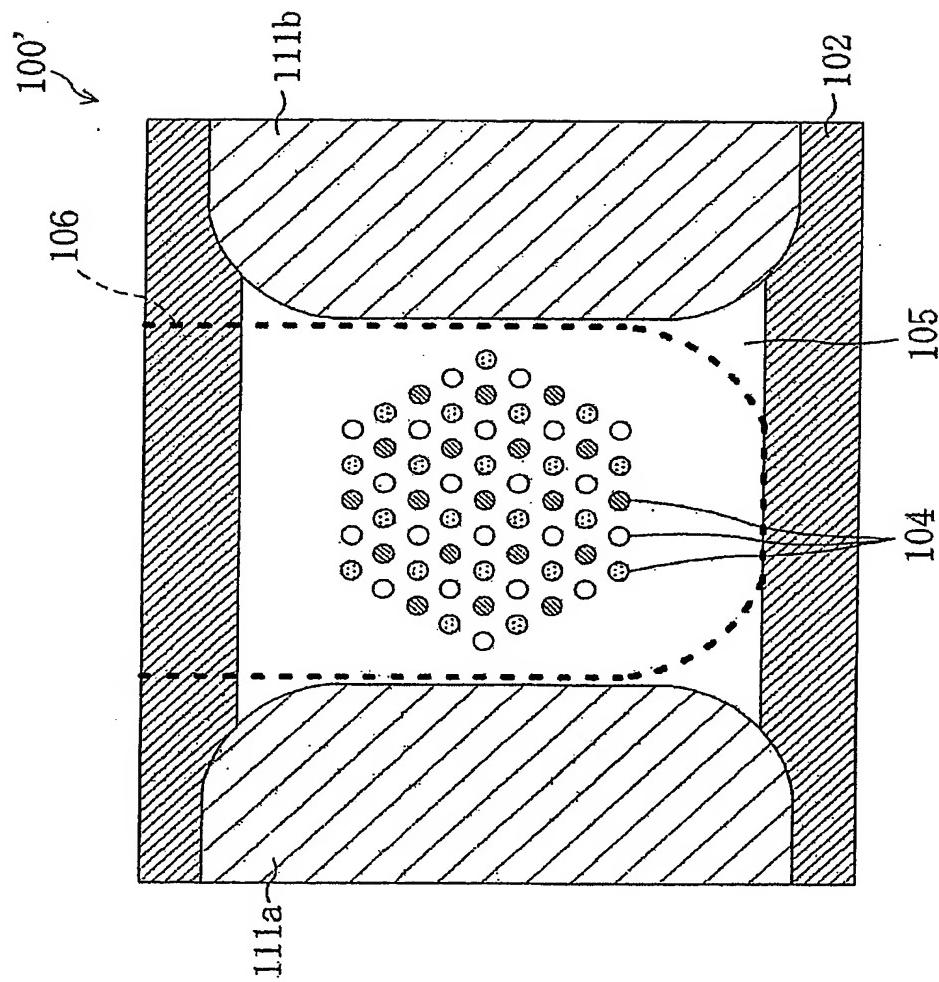
第4図



第5図

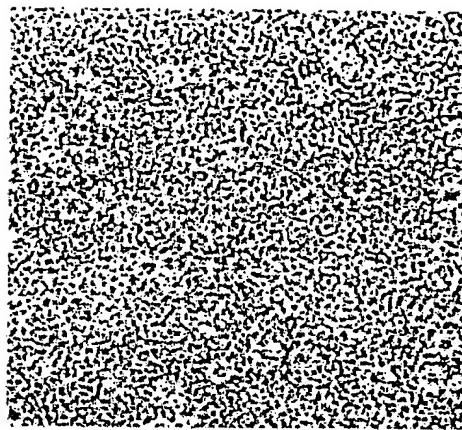


第6図

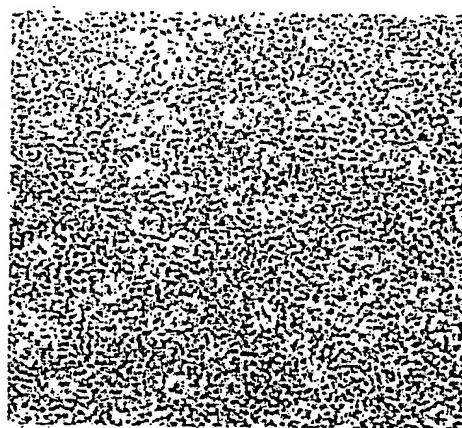


第7図

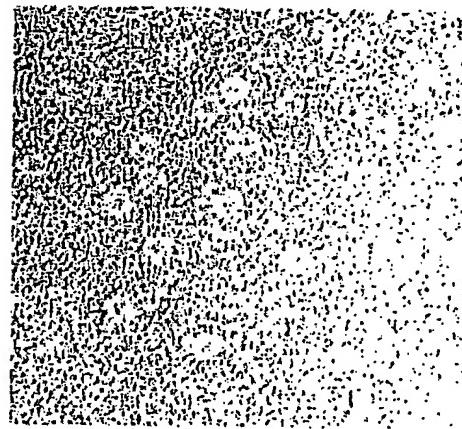
(a)



(b)

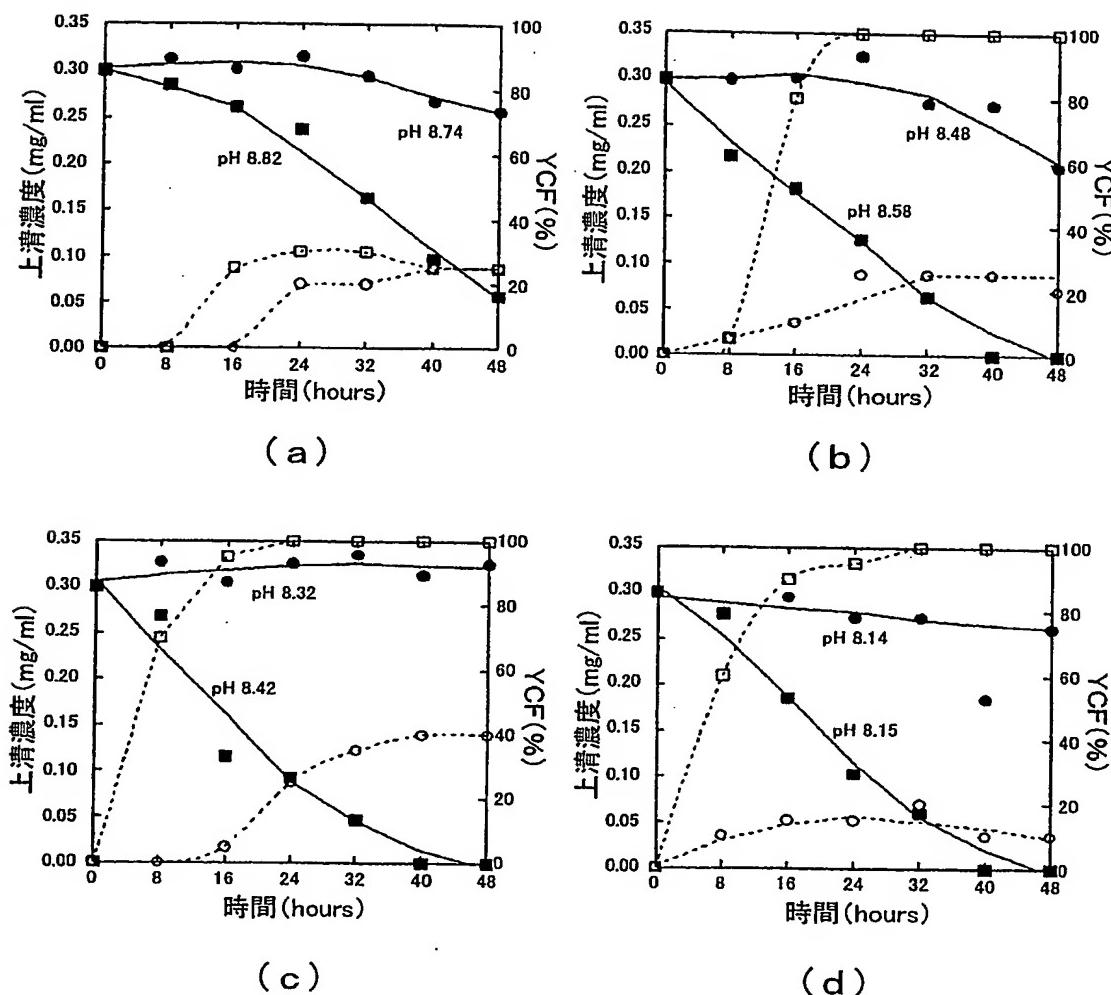


(c)



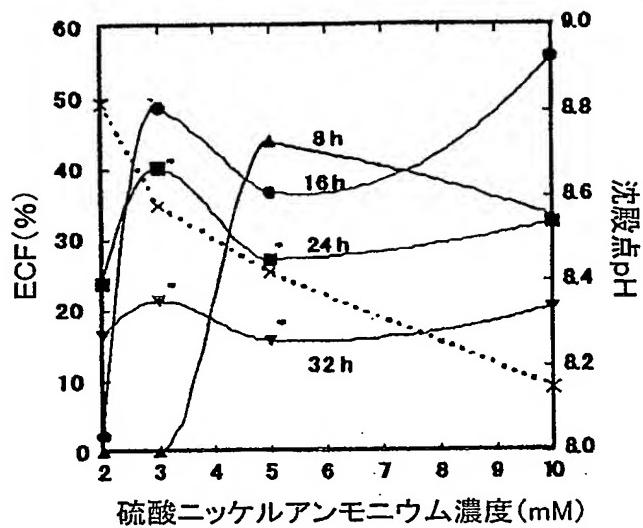
差替え用紙(規則26)

第8図



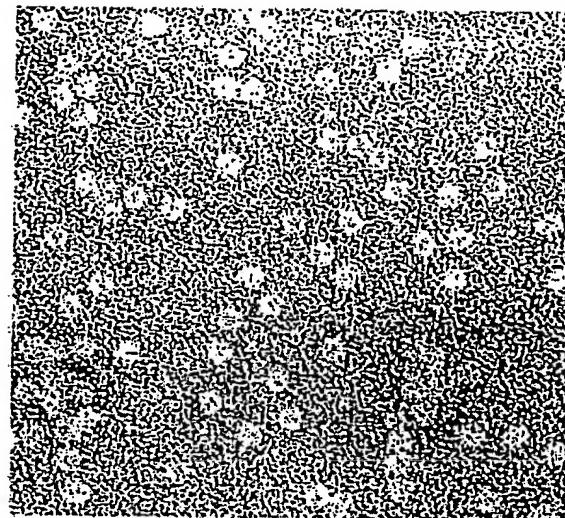
9 / 12

第9図

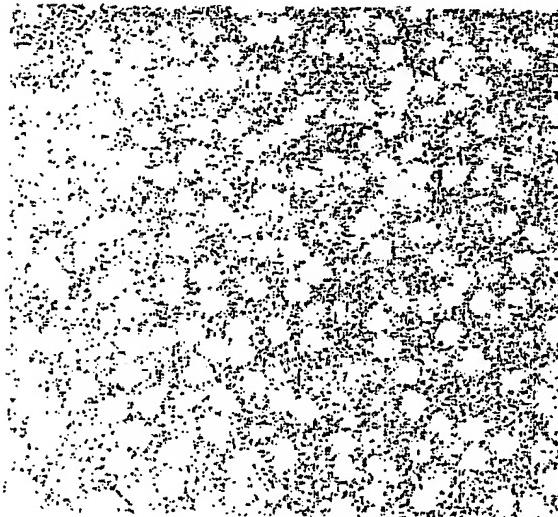


第 10 図

(a)



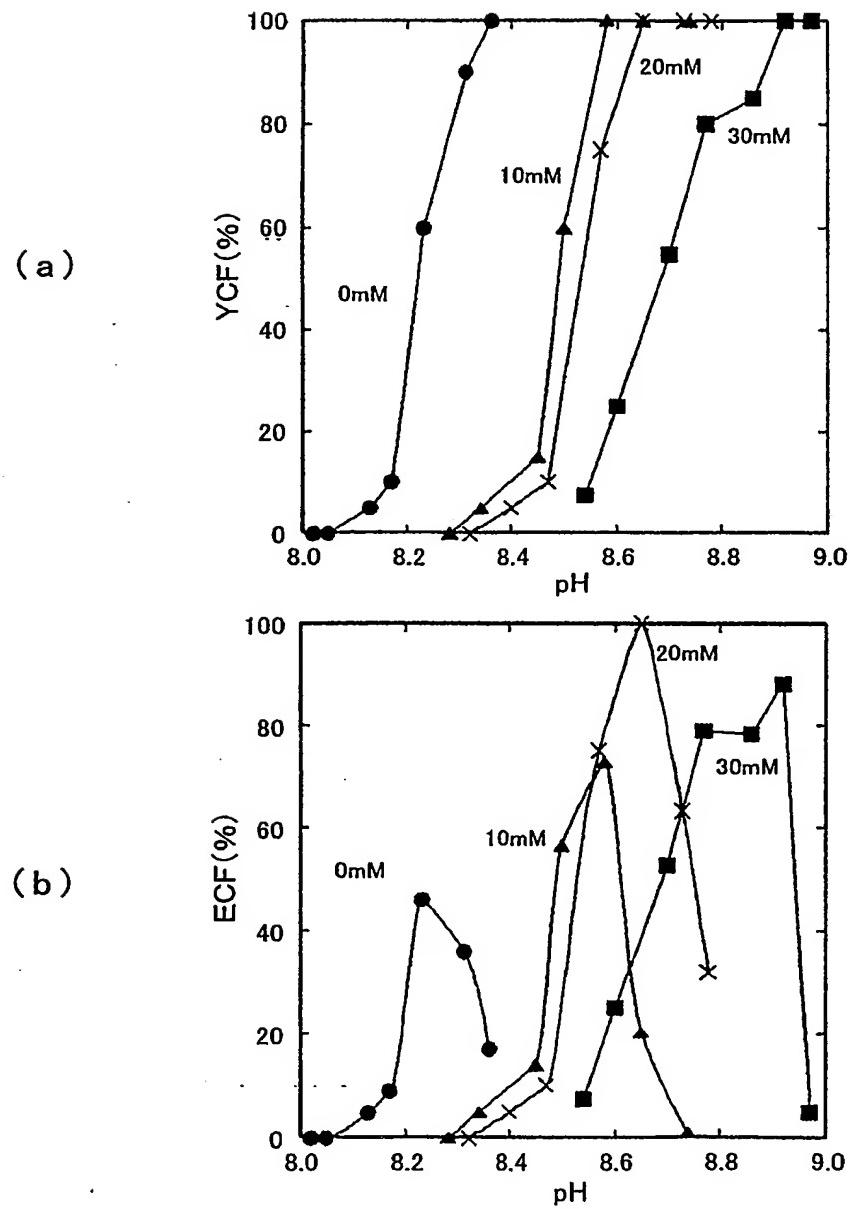
(b)



差替え用紙 (規則26)

11/12

第 11 図



参照符号一覧表

- 1 アポフェリチン
- 2 チャンネル
- 4 保持部
- 100, 100' メモリセル
- 101 p型Si基板
- 102 素子分離酸化膜
- 103 ゲート酸化膜
- 104 ドット体
- 104a ナノ粒子
- 105 シリコン酸化膜
- 106 Al電極
- 107a 第1n型拡散層
- 107b 第2n型拡散層
- 108 層間絶縁膜
- 109 コンタクトホール
- 110 タングステンプラグ
- 111a 第1アルミニウム配線
- 111b 第2アルミニウム配線
- 130 基板
- 140 タンパク質分子
- 150 ニッケル化合物ーアポフェリチン複合体
- 160 液体
- 170 ポリペプチド膜

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11810

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ B82B3/00, H01L21/8247, 27/115, 29/06, 29/788, 29/792

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ B82B3/00, H01L21/8247, 27/115, 29/06, 29/788, 29/792,
C07K1/00-123:00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Web of Science: ((ferritin* OR apoferritin*) AND (carbonic* OR carbonate*)), ((ferritin* OR apoferritin*) AND (nickel OR Ni OR chromium OR Cr OR copper OR Cu) AND (See extra sheet))

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98/22942 A1 (MAYES, Eric, Leigh), 28 May, 1998 (28.05.98), The whole document (especially, page 5, lines 19 to 27) & JP 2001-504277 A	14, 15 1-11, 13
Y	US 2002/0119093 A1 (MURAYAMA et al.), 29 August, 2002 (29.08.02), Claims 1, 5, 7 & JP 2002-255515 A	1-11, 13
A	JP 2001-181842 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 03 July, 2001 (03.07.01), Full text (particularly, Claim 6) (Family: none)	1-15

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
30 January, 2004 (30.01.04)Date of mailing of the international search report
10 February, 2004 (10.02.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11810

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0881691 A2 (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 02 December, 1998 (02.12.98), The whole document (especially, Claim 42) & US 6121075 A & JP 11-045990 A	1-15
P,X	Okuda M. et al., "Fabrication of nickel and chromium nanoparticles using the protein cage of apoferritin", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, Vol.84, No.2, pages 187 to 194, 01 August, 2003 (01.08.03)	1-15

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11810

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

(particle*)), (protein* AND (carbonic* OR carbanate*)) AND (nickel OR Ni OR chromium OR Cr OR copper OR Cu))

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP03/11810

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C1' B82B3/00,
H01L21/8247, 27/115, 29/06, 29/788, 29/792

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C1' B82B3/00,
H01L21/8247, 27/115, 29/06, 29/788, 29/792,
C07K1/00-123:00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
日本国公開実用新案公報 1971-2004年
日本国実用新案登録公報 1996-2004年
日本国登録実用新案公報 1994-2004年

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

Web of Science: ((ferritin* OR apoferritin*) AND (carbonic* OR carbonate*)), ((ferritin* OR apoferritin*) AND (nickel OR Ni OR chromium OR Cr OR copper OR Cu) AND (particle*)), (protein* AND (carbonic* OR carbonat e*)) AND (nickel OR Ni OR chromium OR Cr OR copper OR Cu))

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 98/22942 A1 (MAYES, Eric, Leigh) 1998. 05. 28, the whole document (especially p. 5 lines19-27) & JP 2001-504277 A	14, 15
Y	US 2002/0119093 A1 (MURAYAMA et. al.) 2002. 08. 29, Claim1, 5, 7 & JP 2002-255515 A	1-11, 13

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30. 01. 2004

国際調査報告の発送日

10. 2. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

佐藤 秀樹

2M 3154

電話番号 03-3581-1101 内線 6480

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO3/11810

C(続き)	関連すると認められる文献	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P 2001-181842 A (松下電器産業) 2001. 07. 03, 全文 (特に請求項6) (ファミリーなし)	1-15
A	E P 0881691 A2 (Matsushita Electric Industrial C o., Ltd.) 1998. 12. 02, the whole document (especially Claim 42) & US 6121075 A & J P 11-045990 A	1-15
P X	Okuda M, et.al., "Fabrication of nickel and chromium nanoparticles using the protein cage of apoferritin", BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, Vol. 84, No. 2, p. 187-194, 2003. 08. 01, ,	1-15

様式PCT/ISA/210(第2ページの続き) (1998年7月)